

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-210166

(43)Date of publication of application : 29.07.2003

(51)Int.Cl.

C12N 11/02

C12N 3/00

C12N 5/10

C12P 21/02

(21)Application number : 2002-328721

(71)Applicant : SANYO CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 12.11.2002

(72)Inventor : KUROKAWA SUKEHITO

(30)Priority

Priority number : 2001351232

Priority date : 16.11.2001

Priority country : JP

(54) CELL-ADHERED SUBSTRATE FOR POIKILOTHERMIC ANIMAL- ORIGINATED CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a cell-adhered substrate which can efficiently proliferate a poikilothermic animal-originated cell in a state free from a risk that an infectious substance such as a prion or a human being-infecting virus is contained.

SOLUTION: This cell-adhered substrate is characterized by adhering (A) the poikilothermic animal-originated cell to (B) the substrate with (X) a cell- adhesive artificial peptide and/or (Y) a cell-adhesive auxiliary artificial peptide. (X) is a peptide which contains the minimum amino acid sequence (sh) exhibiting a cell-adhesive signal and has an amino acid sequence (jh) obtained by polymerizing a repeating unit comprising at least three amino acids in a polymerization degree of at least 3. (Y) is a peptide which does not contain the minimum amino acid sequence (sh) and has an amino acid sequence (jh) obtained by polymerizing a repeating unit comprising at least three amino acids in a polymerization degree of at least 3. (A) is preferably an insect cell.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-210166
(P2003-210166A)

(43) 公開日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 11/02	Z N A	C 1 2 N 11/02	Z N A 4 B 0 2 9
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	A 4 B 0 3 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 5/00	B 4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 21 頁)			

(21) 出願番号 特願2002-328721(P2002-328721)
(22) 出願日 平成14年11月12日 (2002. 11. 12)
(31) 優先権主張番号 特願2001-351232(P2001-351232)
(32) 優先日 平成13年11月16日 (2001. 11. 16)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002288
三洋化成工業株式会社
京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(72) 発明者 黒川 祐人
京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋
化成工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変温動物由来細胞の細胞接着基材

(57) 【要約】

【課題】 プリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性がなく、変温動物由来細胞を効率よく増殖させることができる細胞接着基材を提供することである。

【解決手段】 細胞接着性人工ペプチド (X) 及び／又は細胞接着補助人工ペプチド (Y) を用いて、変温動物由来細胞 (A) 及び基材 (B) を接着させてなることを特徴とする細胞接着基材を用いる。(X) は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列 (s h) を含み、(Y) は、(s h) を含まないペプチドであって、少なくとも3個のアミノ酸からなる反復単位が、少なくとも重合度3で重合したアミノ酸配列 (j h) を有するペプチドである。(A) としては昆虫細胞が好ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞接着性人工ペプチド(X)及び/又は細胞接着補助人工ペプチド(Y)を用いて、変温動物由来細胞(A)及び基材(B)を接着させてなることを特徴とする細胞接着基材。

【請求項2】細胞接着性人工ペプチド(X)を必須構成成分として用いてなり、(X)の細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(s h)が、アミノ酸3文字表記で表わされる、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列(9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys(10)、His Ala Val配列及びTyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列(11)からなる群より選ばれる少なくとも1種の配列である請求項1記載の細胞接着基材。

【請求項3】細胞接着補助人工ペプチド(Y)を必須構成成分として用いてなり、(Y)のアミノ酸配列が、アミノ酸3文字表記で表わされる、Gly Ala Gly Ala Gly Ser(12)及び/又はGly Val Gly Val Pro(13)である請求項1又は2記載の細胞接着基材。

【請求項4】変温動物由来細胞(A)が昆虫細胞である請求項1～3のいずれかに記載の細胞接着基材。

【請求項5】細胞接着性人工ペプチド(X)及び/又は細胞接着補助人工ペプチド(Y)を用いて、変温動物由来細胞(A)と基材(B)とを接着させることを特徴とする細胞接着基材の生産方法。

【請求項6】請求項4に記載の細胞接着基材を用いて細胞培養することを特徴とするウイルス感染昆虫細胞の生産方法。

【請求項7】請求項6記載の生産方法で生産されるウイルス感染昆虫細胞を用いることを特徴とする有用蛋白質の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞接着基材に関する。さらに詳しくは、変温動物由来細胞と基材とを接着させてなる細胞接着基材に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、変温動物由来細胞と基材とを接着させてなる細胞接着基材として、天然由来のコラーゲンや絹蛋白質を基材にコーティングしたものに変温動物由来細胞を接着させてなる細胞接着基材が知られている(特許文献1)。

【0003】

【特許文献1】特開平11-243948号公報。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】天然由来のコラーゲンや絹蛋白質を基材にコーティングしたものに変温動物由来細胞を接着させてなる細胞接着基材は、天然由来の蛋白質を用いるため蛋白質中にプリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性があるという問題点及び細胞接着性が低いという問題点があった。すなわち、本発明の目的は、天然由来の蛋白質を使用せず、細胞接着性の高い細胞接着基材を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究を重ねてきた結果、特定のペプチドを使用することにより上記目的を達成することを見だし本発明に到達した。すなわち、本発明の細胞接着基材の特徴は、変温動物由来細胞(A)及び基材(B)と、細胞接着性人工ペプチド(X)及び/又は細胞接着補助人工ペプチド(Y)を用いて、変温動物由来細胞(A)及び基材(B)を接着させてなる点にある。

【0006】

【発明の実施の形態】細胞接着性人工ペプチド(X)は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(s h)を有している。なお、「細胞接着シグナルを現わす」とは、特定の最小アミノ酸配列(s h)が細胞のインテグリンレセプターに認識されることを意味する(大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年)。

【0007】細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(s h)としては、例えば、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」や「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されているもの等が用いられる。これらの最小アミノ酸配列(s h)の中で好ましいものは、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列(9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys(10)、His Ala Val配列及びTyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列(11)である。さらに好ましいものは、変温動物由来細胞(A)への接着性が高い点で、Arg Gly Asp配列、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、及びIle Lys Val Ala Val配列(7)である。なお、アミノ酸配列は3文字表記で表し、()内にアミノ酸配列表中の対応する配列番号を記載する(以下、同じである。))。

【0008】細胞接着性人工ペプチド(X)は、前記最小アミノ酸配列(s h)を1分子中に少なくとも1個有すればよいが、変温動物由来細胞(A)への接着性が高い点で、1分子中に2~50個有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に3~30個、特に好ましくは1分子中に5~20個有するものである。細胞接着性人工ペプチド(X)の数平均分子量は、300~3,000,000が好ましく、さらに好ましくは1,000~1,000,000、特に好ましくは3,000~300,000である。すなわち、(X)の数平均分子量の上限は3,000,000が好ましく、さらに好ましくは1,000,000、特に好ましくは300,000であり、同様に下限は300が好ましく、さらに好ましくは1,000、特に好ましくは3,000である。なお、数平均分子量は、SDS-PAGE(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)法で、測定サンプルを水中で分離し、泳動距離を標準物質と比較することによって求めるものである(以下、同じである。)

【0009】細胞接着性人工ペプチド(X)としては、例えば、Arg Gly Asp Ser配列(14)からなるペプチド、Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)からなるペプチド、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列(16)からなるペプチド、Arg Gly Asp Ser ProAla Ser Ser Lys Pro配列(17)からなるペプチド、Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala配列(18)からなるペプチド、Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser配列(19)からなるペプチド、Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg配列(20)からなるペプチド、Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp配列(21)からなるペプチド及びこれらの少なくとも一種のペプチドからなる重合体等が例示できる。重合体としては、例えば、(Arg Gly Asp Ser)_n配列(22)、(Arg Gly Asp Ser)_m配列(23)、(Arg Gly Asp Ser)_k配列(24)、(Gly Arg Gly Asp Ser)_n配列(25)、(Gly Arg Gly Asp Ser Pro)_n配列(26)、(Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro)_n配列(27)、(Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala)_n配列(28)、(Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser)_n配列(29)、(Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg)_n配列(30)、又は(Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp)_n配列(31)配列からなるペプチド等が挙げられる。該重合体の重合度は、2~50が好ましく、さらに好ましくは3~30、特に好ましくは4~20、最も好ましくは4~16である。

【00010】細胞接着補助人工ペプチド(Y)は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(s h)を含まないペプチドであって、少なくとも3個のアミノ酸が

らなる反復単位が、少なくとも重合度3で重合した構造(アミノ酸配列)(j h)を有するペプチドである。少なくとも3個のアミノ酸からなる反復単位としては、例えば、「特表平3-502935号公報、反復単位」や「Abraham J. Dombら著、Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers発行、Amsterdam、1997年、ブロック配列」に記載されているもの等が用いられる。これらの反復単位のうち、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)、Gly Val Gly Val Pro配列(13)、Gly Pro Pro配列、Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly配列(32)、Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln配列(33)及びGly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro配列(34)が好ましく、変温動物由来細胞(A)への接着性が高いという観点から、さらに好ましくはGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)、Gly Val Gly Val Pro配列(13)及びGly Pro Pro配列、特に好ましくはGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)である。

【00011】細胞接着補助人工ペプチド(Y)は、反復単位を少なくとも重合度3で重合した構造(j h)を有するペプチドであればよいが、変温動物由来細胞(A)への接着性が高い点で、反復単位を、1分子中に3~10,000個有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に10~3,000個、特に好ましくは1分子中に30~1,000個有するものである。細胞接着補助人工ペプチド(Y)の数平均分子量は、500~5,000,000が好ましく、さらに好ましくは1,500~1,500,000、特に好ましくは5,000~500,000である。すなわち、(Y)の数平均分子量の上限は5,000,000が好ましく、さらに好ましくは1,500,000、特に好ましくは500,000であり、同様に下限は500が好ましく、さらに好ましくは1,500、特に好ましくは5,000である。

【00012】細胞接着補助人工ペプチド(Y)としては、例えば、「特表平3-502935号公報」や「Abraham J. Dombら著、Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers発行、Amsterdam、1997年」に記載されているもの等が用いられる。これらの細胞接着補助人工ペプチド(Y)のうち、1分子中にGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)を約170個有する数平均分子量約10万のペプチド(a)、1分子中に(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(35)とGly Ala Ala Gly Tyr配列(36)とをそれぞれ約18個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(b)、(Gly Val Gly Val Pro)_n配列(37)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(38)とをそれぞれ約11個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(c)、(Gly Val Gly Val Pro)_n配列(39)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(38)とをそれぞれ約8個づつ有する数

平均分子量約10万のペプチド(d)、(Gly Val Gly Val Pro)_n配列(40)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(38)とをそれぞれ約7個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(e)、(Gly Val Gly Val Pro)_n配列(37)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(41)とをそれぞれ約12個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(f)、及び(Gly Val Gly Val Pro)_n配列(37)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(42)とをそれぞれ約12個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(g)が好ましく、さらに好ましくはペプチド(a)及びペプチド(b)である。

【0013】細胞接着性人工ペプチド(X)及び細胞接着補助人工ペプチド(Y)は、人工的に製造されるものであり、例えば、有機合成法(酵素法、固相合成法及び液相合成法等)、及び遺伝子組み換え法によって容易に製造できる。有機合成法に関しては、例えば、「生化学実験講座1、タンパク質の化学IV(1981年7月1日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行)」や「続生化学実験講座2、タンパク質の化学(下)(昭和62年5月20日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行)」に記載されている方法等が適用できる。

【0014】遺伝子組み換え法に関しては、例えば、「特表平3-502935号公報」に記載されている方法等が適用できる。なお、遺伝子組み換え法による場合、組み換え微生物由来の不純物を含むことがあるため、抗ペプチド抗体等を用いたアフィニティ精製等によって精製し、ペプチドの純度を80重量%以上にすることが好ましく、さらに好ましくは90重量%以上、特に好ましくは95重量%以上である。これらのうち、細胞接着性人工ペプチド(X)及び細胞接着補助人工ペプチド(Y)のアミノ酸配列を容易に設計・製造できるという観点から、遺伝子組み換え法が好ましい。

【0015】有機合成法による細胞接着性人工ペプチド(X1)としては、例えば、Arg Gly Asp Ser配列(14)、Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列(16)及びArg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro配列(17)からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。有機合成法による細胞接着補助人工ペプチド(Y1)としては、例えば、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)及び/又はGly Val Gly Val Pro配列(13)を有するペプチド等が挙げられる。

【0016】遺伝子組み換え法による細胞接着性人工ペプチド(X2)としては、例えば、Arg Gly Asp配列、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)及びIle Lys Val Ala Val配列(7)からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。遺伝子組み換え法による細胞接着補助人工ペプチド(Y2)としては、例えば、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)、Gly Val Gly Val Pro配列(13)及びGly Ala P

ro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro配列(43)からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

【0017】細胞接着性人工ペプチド(X)及び細胞接着補助人工ペプチド(Y)は、同一分子内にあってもよく、すなわち、(X)及び(Y)に換えて、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(sh)と、少なくとも3個のアミノ酸からなる反復単位を少なくとも重合度3で重合してなるアミノ酸配列(jh)(細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(sh)を含まない)とを有するペプチド(Z)を用いることができる。このような細胞接着性人工ペプチド(X)と細胞接着補助人工ペプチド(Y)とが同一分子内にあるペプチド(Z)は、変温動物由来細胞(A)へのペプチドの接着性が高いという観点から好ましい。

【0018】ペプチド(Z)は、最小アミノ酸配列(sh)を1分子中に少なくとも1個有すればよいが、変温動物由来細胞(A)への接着性が高い点で、1分子中に2個以上有するものが好ましく、さらに好ましくは3個以上、特に好ましくは5個以上有するものであり、また、50個以下有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に30個以下、特に好ましくは1分子中に20個以下有するものである。また、ペプチド(Z)は、アミノ酸配列(jh)を1分子中に少なくとも1個有すればよいが、熱に対する安定性の観点から、1分子中に2個以上有するものが好ましく、さらに好ましくは3個以上、特に好ましくは5個以上有するものであり、また、50個以下有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に30個以下、特に好ましくは1分子中に20個以下有するものである。

【0019】ペプチド(Z)において、最小アミノ酸配列(sh)とアミノ酸配列(jh)との個数の比率{(jh)/(sh)}は、0.2以上が好ましく、さらに好ましくは0.5以上、特に好ましくは0.8以上であり、また、5以下が好ましく、さらに好ましくは2以下、特に好ましくは1.3以下である。最小アミノ酸配列(sh)とアミノ酸配列(jh)とは、ペプチド

(Z)のβターン構造の取りやすさ等の観点から、最小アミノ酸配列(sh)とアミノ酸配列(jh)とが交互に位置することが好ましい。

【0020】ペプチド(Z)としては、例えば、「特表平3-502935号公報」や「Abraham J. Dombら著、Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publishers発行、Amsterdam、1997年」等に記載の(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(35)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(h)、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(35)とTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)とをそれぞれ約13個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(i)、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列

(35)とIle LysVal Ala Val配列(7)とをそれぞれ約12個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド

(j)、(Gly Val Gly Val Pro)配列(37)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)12配列(44)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個づつ有する数平均分子量約10万のペプチド(k)、及び(Gly Ala Pro Gly Pro Pro GlyPro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro)配列とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約6個づつ有する数平均分子量約5万のペプチド(1)等が挙げられる。

【0021】市場から入手できるペプチド(X)としては、商品名を記載すると例えば、RGDS [Arg Gly Asp Ser配列(14)]を1個含有してなるペプチド、数平均分子量約400、(株)ペプチド研究所製、GRGD S [Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)]を1個含有してなるペプチド、数平均分子量約500、(株)ペプチド研究所製、RetroNectin (リコンビナントヒトフィブロネクチンCH-296) [ヒトフィブロネクチン細胞接着シグナルであるCS1シグナルと細胞接着ドメインType III及びヘパリン結合ドメインIIを1つずつ有する数平均分子量約6万のペプチド、宝酒造(株)製(Arg Gly Asp Ser配列(14)]を約1個含有)、及びRGDS-Protein A [Arg Gly Asp配列をProtein A (IgG結合ドメイン)に挿入した数平均分子量約3万のペプチド、宝酒造(株)製(Arg Gly Asp Ser配列(14)]を約1個含有)等が挙げられる。

【0022】市場から入手できるペプチド(Z)としては、商品名を記載すると例えば、プロネクチンF [1分子中にArg Gly Asp配列と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)配列(35)とを各々約12個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造される数平均分子量約10万のペプチド、三洋化成工業(株)製]、プロネクチンFプラス [プロネクチンFをジメチルアミノエチルクロライドと反応させて水溶性にしたもの、三洋化成工業(株)製]、プロネクチンL [1分子中にIle Lys Val AlaVal配列(7)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)配列(35)とを各々約12個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造される数平均分子量約10万のペプチド、三洋化成工業(株)製]等が挙げられる。なお、市場から入手できるペプチド(Y)は知られていないが、上記の製造方法により容易に得ることができる。

【0023】変温動物由来細胞(A)としては、魚類(例えば、コイ、ナマズ、サケ、マス、サバ及びスズキ等)、両生類(例えば、カエル、サンショウウオ及びイモリ等)、は虫類(例えば、カメ、トカゲ、ヘビ及びワニ等)、原索動物(例えば、ヒゲムシ、ホヤ及びタリア等)、棘皮動物(例えば、ヒトデ、ナマコ及びウニ等)、節足動物(例えば、昆虫、甲殻類、クモ、ヤスデ、ムカデ及びカブトガニ等)、環形動物(例えば、ゴカイ、ミミズ、ヒル及びイムシ等)、軟体動物(例え

ば、カイ、イカ及びタコ等)、扁形動物(例えば、渦虫、吸虫、二生類及び条虫等)、刺胞動物(例えば、ヒドロ虫、鉢虫及び花虫等)、海綿動物(例えば、石灰海綿類、六放海綿類、四軸海綿類及び珪角海綿類等)及び原生動物(例えば、鞭毛虫、肉質虫及び孢子虫等)等の岩波生物学辞典(山田常雄ら編集、株式会社岩波書店発行)に記載の変温動物からなる群より選ばれる少なくとも1種の動物に由来する細胞等が挙げられる。

【0024】これらのうち、魚類の細胞、両生類の細胞、は虫類の細胞及び節足動物の細胞が好ましく、さらに好ましくは両生類の細胞及び節足動物の細胞、特に好ましくは節足動物の細胞、さらに特に好ましくは昆虫の細胞、甲殻類の細胞、クモ類の細胞及びヤスデ類の細胞、より特に好ましくは昆虫の細胞及び甲殻類の細胞、最も好ましくは昆虫の細胞である。

【0025】昆虫の細胞としては、カイコ細胞、クワコ細胞、サクサン細胞、シンジュサン細胞、ヨトウガ細胞、クワゴマダラヒトリ細胞、ハマキムシ細胞、ショウジョウバエ細胞、センチニクバエ細胞、ヒトスジシマカ細胞、アゲハチョウ細胞、ワモンゴキブリ細胞及びイラクサキンウワバ細胞等が挙げられ、これらのうち、カイコ細胞、サクサン細胞、ヨトウガ細胞、イラクサキンウワバ細胞、クワゴマダラヒトリ細胞、ショウジョウバエ細胞、センチニクバエ細胞、アゲハチョウ細胞及びワモンゴキブリ細胞が好ましく、さらに好ましくはカイコ細胞、ヨトウガ細胞、イラクサキンウワバ細胞、センチニクバエ細胞及びワモンゴキブリ細胞、特に好ましくはカイコ細胞、ヨトウガ細胞及びイラクサキンウワバ細胞である。

【0026】カイコ細胞としてはBmN細胞及びBoMo細胞等が挙げられ、ヨトウガ細胞としてはSf9細胞及びSf21細胞等が挙げられ、イラクサキンウワバ細胞としてはTn-5細胞、HIGH FIVE細胞及びMG1細胞等が挙げられる。変温動物由来細胞(A)の由来は、細胞が採取できる部位であれば何れでもよいが、細胞採取し易いという観点から、胚、卵巣、脂肪体および血球が好ましい。

【0027】変温動物由来細胞(A)は、遺伝子を導入(組み換え)した変温動物由来細胞であってもよい。細胞に遺伝子を導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト融合法、DEAEデキストラン法、リポフェクション法、カチオン性物質利用法、ウイルス法及びパーティクルガン法等の遺伝子工学キーワードブック(緒方宣邦著、株式会社羊土社発行、2000年)や生物化学実験法45組換えタンパク質生産法(塚越規弘編著、株式会社学会出版センター、2001年)に記載の方法等が適用できる。これらのうちカチオン性物質利用法及びウイルス法が好ましい。

【0028】基材(B)としては特に制限はなく、細胞

が接着でき、細胞培養ができるものであれば何れも使用できる。基材(B)の形状としては、細胞培養に一般に用いられる形状[例えば、細胞培養の技術(日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年)に記載の形状]等が使用でき、例えば、板状、穴付きプレート(6穴、24穴、96穴プレート等)、シャーレ、フラスコ、ボトル、ビーズ及びファイバー等が挙げられる。基材(B)の材質としては、細胞培養に一般に用いられる材質[例えば、細胞培養の技術(日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年)に記載の材質]等が使用でき、例えば、ガラス、シリコン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、アクリル樹脂及びポリウレタン等が挙げられる。

【0029】本発明の細胞接着基材は、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を、基材(B)の表面に付着した状態及び/又は基材(B)に練り込まれた状態とすることにより生産することができる。ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)が、基材(B)の表面に付着した状態及び/又は基材(B)に練り込んだ状態のうち、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)の使用量が少なくなくて済むという観点から、基材(B)の表面に付着した状態が好ましい。

【0030】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)の表面に付着した状態にさせる方法としては、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を物理的に接触させる方法及び化学的に結合させる方法等が挙げられる。

【0031】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を物理的に接触させる方法としては、例えば、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を溶媒(S1)等に溶解又は分散させた溶液又は分散液を、基材(B)に塗工、含浸又は混合させる方法等が適用できる。そしてその後、乾燥させることによって、(X)及び/又は(Y)が付着した細胞接着基材を得ることができる(例えば、「Esty, A. Biomedical Products 1991年」に記載の方法等)。

【0032】溶媒(S1)としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、アミノ酸、ビタミン、アルコール、脂質・糖、酸及び/又は塩基を含有する水溶液、水及び体液等が使用できる。水溶液中の無機塩、有機酸塩、アミノ酸、ビタミン、アルコール、脂質・糖、酸及び/又は塩基の含有量は、水溶液の重量に基づいて、0.001~50重量%が好ましく、さらに好ましくは0.01~10重量%である。すなわち、この含有量の上限は50重量%が好ましく、さらに好ましくは10重量%であり、またこの含有量の下限は0.001重量%が好ましく、さらに好ましくは0.01重量%である。

【0033】無機塩としては、ハロゲン化金属塩、硫酸金属塩、リン酸金属塩、硝酸金属塩、炭酸金属塩及び過ハロゲン酸金属等が使用でき、塩化ナトリウム、硫酸ナ

トリウム、リン酸ナトリウム、塩化カルシウム、硝酸鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、硫酸銅、硫酸鉄、塩化リチウム、臭化ナトリウム、臭化リチウム過塩素酸ナトリウム及び過塩素酸リチウム等が挙げられる。有機酸塩としては、蟻酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム及び酒石酸ナトリウム等が挙げられる。

【0034】アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、セリン及びグリシン等が挙げられる。ビタミンとしては、コリン、イノシトール、ニコチンアミド、グルタミン、ビタミンA、ビタミンB₁₂及びビタミンC等が挙げられる。アルコールとしては、炭素数1~4のアルコール等が使用でき、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及びブタノール等が挙げられる。脂質・糖としては、脂質、単糖、2糖、オリゴ糖、アミノ糖及び酸性糖等が挙げられる。

【0035】酸としては、無機酸及び炭素数1~6の有機酸等が使用でき、塩酸、磷酸、酢酸、蟻酸、フェノール及び硫酸等が挙げられる。塩基としては、無機塩基及び炭素数2~6の有機塩基等が使用でき、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア及びトリエチルアミン等が挙げられる。水としては、蒸留水、イオン交換水、水道水及びイオン交換蒸留水等が挙げられる。体液としては、血液、血漿、血清及び尿等が挙げられる。これらの溶媒(S1)の中で、無機塩、酸及び/又は塩基を含有する水溶液及び水が好ましく、さらに好ましくは無機塩、酸及び/又は塩基を含有する水溶液である。

【0036】さらに、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を培地に溶解又は分散させることにより、その培地溶液(分散液)を変温動物由来細胞(A)の培地として使用し、変温動物由来細胞(A)の培養するとともに、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)の表面に付着させることもできる。この場合、通常、変温動物由来細胞(A)は基材上で培養されるが、培地中で培養された変温動物由来細胞(A)が基材に接着される場合もありうる。

【0037】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を化学的に結合させる方法としては、例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド又はカルボジイミド等の存在下に、基材(B)にペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)をエステル化又はアミド化により固定させ、洗浄乾燥させる方法等が適用できる。なお、この場合、反応溶媒を使用してもよく、反応溶媒としては公知のものが使用でき、例えば、溶媒(S1)及び有機溶剤等が用いられる。有機溶媒としては、アセトン、エタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチル

アセトアミド及びテトラヒドロフラン等が挙げられる。これらのうち好ましくは、水及び有機溶媒である。ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を化学的に結合させる場合、化学反応に関与する官能基としては、カルボキシル基、アミノ基及び水酸基等が挙げられる。

【0038】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)に練り込まれた状態にさせる方法としては、成形前の基材(B)の溶液にペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を投入した混合物を、所定の形状に成形する方法等が挙げられ、例えば、熱可塑性樹脂(ポリエチレン、ポリスチレン及びポリアミド等)を融点温度以上にして流動可能状態とした後、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を投入し、その混合物を押出成形や射出成形などで加工する方法や、熱硬化性樹脂(尿素樹脂、メラミン樹脂、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、不飽和ポリエステル、アルキド樹脂、ウレタン樹脂、エポナイト及びシリコン樹脂等)に、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を投入し、その混合物を硬化温度以上にして加工する方法等が適用できる。

【0039】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)の表面に付着させる場合、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)の含有溶液(分散液)中の(X)及び/又は(Y)の濃度は、(X)及び/又は(Y)の含有溶液(分散液)の重量に基づいて、 $0.01\mu\text{g/g} \sim 999\text{mg/g}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.01\mu\text{g/g} \sim 100\text{mg/g}$ 、特に好ましくは $0.1\mu\text{g/g} \sim 10\text{mg/g}$ 、最も好ましくは $1\mu\text{g/g} \sim 1\text{mg/g}$ である。すなわち、この場合、濃度の上限は 999mg/g が好ましく、さらに好ましくは 100mg/g 、特に好ましくは 10mg/g 、最も好ましくは 1mg/g であり、同様に下限は $0.001\mu\text{g/g}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.01\mu\text{g/g}$ 、特に好ましくは $0.1\mu\text{g/g}$ 、最も好ましくは $1\mu\text{g/g}$ である。

【0040】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)の表面に付着させた場合、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)の含有量としては、基材(B)の培養単位面積あたり、 $0.1\text{ng/cm}^2 \sim 100\text{mg/cm}^2$ が好ましく、さらに好ましくは $1\text{ng/cm}^2 \sim 10\text{mg/cm}^2$ 、特に好ましくは $10\text{ng/cm}^2 \sim 1\text{mg/cm}^2$ 、最も好ましくは $100\text{ng/cm}^2 \sim 100\mu\text{g/cm}^2$ である。なお、培養単位面積は、基材(B)の表面のうち、培養される細胞が接着し得る表面の表面積を意味する。ここで、細胞が入り込まないような微小な凹凸(例えば、 $1\mu\text{m}$ 以下)は平坦な表面として取扱うが、培養単位面積を高める目的でリブ(畝)等が設けてあるものについてはそのリブの表面積を培養単位面積に含まれる。また、基材(B)の培養単位面積は、基材メーカーがカタログに記載している基材の培養単位面積をそのまま適用できる。培養単位面積あ

たりのペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)の含有量の測定方法は特に限定されないが、例えば、免疫学的測定法等が利用できる。免疫学的測定法としては、例えば、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)と結合する抗体に酵素を標識したもの(以下、酵素標識抗体)を基材(B)の培養単位面積に反応させ、基材(B)の培養単位面積に結合した酵素標識抗体の酵素量を測定する方法等が挙げられる。

【0041】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を基材(B)に練り込ませる場合、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)の含有混合物中の(X)及び/又は(Y)の濃度は、含有混合物の重量に基づいて、 $0.01\mu\text{g/g} \sim 999\text{mg/g}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.1\mu\text{g/g} \sim 100\text{mg/g}$ 、特に好ましくは $1\mu\text{g/g} \sim 10\text{mg/g}$ 、最も好ましくは $10\mu\text{g/g} \sim 10\text{mg/g}$ である。すなわち、この場合、濃度の上限は 999mg/g が好ましく、さらに好ましくは 100mg/g 、特に好ましくは 10mg/g 、最も好ましくは 1mg/g であり、同様に下限は $0.01\mu\text{g/g}$ が好ましく、さらに好ましくは $0.1\mu\text{g/g}$ 、特に好ましくは $1\mu\text{g/g}$ 、最も好ましくは $10\mu\text{g/g}$ である。

【0042】ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)を、基材(B)の表面に付着又は基材(B)に練り込んだ後、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法としては特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、 γ 線滅菌、アルコール滅菌、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌等が挙げられる。

【0043】変温動物由来細胞(A)と基材(B)とを接着させる方法としては、細胞を基材に接着させる一般的な方法[例えば、細胞培養の技術(日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年)、生物化学実験法45組換えタンパク質生産法(塚越規弘編著、株式会社学会出版センター、2001年)及び昆虫バイオ工場(木村滋編著、株式会社工業調査会発行、2000年)等に記載の方法]等が使用できる。例えば、 $0.1 \sim 10,000$ 万cellsの変温動物由来細胞(A)及び $0.001 \sim 100\text{mL}$ の培地を、 $0.01 \sim 1,000$ 平方センチメートルの培養単位面積を有する基材(B)に投入し、 $0 \sim 60^\circ\text{C}$ の空気や水等の雰囲気下、1分 \sim 1週間培養して細胞を接着させる方法等が挙げられる。なお、ペプチド(X)及び/又はペプチド(Y)はあらかじめ基材(B)の表面に付着及び/又は基材(B)に練り込ませておくことが好ましい。

【0044】変温動物由来細胞(A)が基材(B)に接着したことの確認方法としては、一般的な確認方法[例えば、細胞培養の技術(日本組織培養学会編集、株式会社朝倉書店発行、1999年)、生物化学実験法45組換えタンパク質生産法(塚越規弘編著、株式会社学会出版センター、2001年)及び昆虫バイオ工場(木村滋

編著、株式会社工業調査会発行、2000年）等に記載の方法]が使用できる。例えば、血球計数法（コールターカウンターの使用など）、顕微鏡観察法（計算盤の使用など）及び染色法（トリパンブルー、エリスロシンB、ニグロシン、クリスタルバイオレット、テトラゾリウム塩の使用など）等が挙げられる。本発明の細胞接着基材において、基材（B）に接着した変温動物由来細胞（A）の数は、基材（B）の培養単位面積当り、50～5,000万cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは500～500万cells/cm²、特に好ましくは5,000～50万cells/cm²である。すなわち、変温動物由来細胞（A）の数の上限は、5,000万cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは500万cells/cm²、特に好ましくは50万cells/cm²、また、この下限は50cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは500cells/cm²、特に好ましくは5,000cells/cm²である。

【0045】本発明の細胞接着基材を用いて細胞培養し細胞を生産する方法としては、例えば、本発明の細胞接着基材及び培地等を用いて、培地を適時交換しながら細胞を培養する方法等が挙げられる。なお、基材（B）に培地と変温動物由来細胞（A）とを接触させて、基材（B）の表面に変温動物由来細胞（A）を接着させた後、培地を適時交換して細胞を培養する方法等でもよい。本発明の細胞接着基材を用いて細胞培養し細胞を生産する方法において、細胞培養の条件としては特に制限はないが例えば、0～60℃の空気や水等の雰囲気下、1時間～1カ月培養する方法などが挙げられる。なお、培地交換しながら細胞培養することが好ましく、その交換頻度としては、1～7日毎が好ましく、さらに好ましくは1～3日毎である。本発明の細胞接着基材を用いて細胞培養し細胞を生産する方法によって得られる変温動物由来細胞（A）の数は、基材（B）の培養単位面積当り、100～1億cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは1,000～1,000万cells/cm²、特に好ましくは1万～100万cells/cm²である。すなわち、変温動物由来細胞（A）の数の上限は、1億cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは1,000万cells/cm²、特に好ましくは100万cells/cm²、また、この下限は100cells/cm²が好ましく、さらに好ましくは1,000cells/cm²、特に好ましくは1万cells/cm²である。

【0046】変温動物由来細胞（A）と基材（B）とを接着させる方法および本発明の細胞接着基材を用いて細胞培養し細胞を生産する方法において、培地の使用量としては、使用する基材（B）の種類などによって異なるが、基材（B）の培養単位面積当り、0.0003～300mL/cm²が好ましく、さらに好ましくは0.0

03～30mL/cm²、特に好ましくは0.03～3mL/cm²である。すなわち、培地の使用量の上限は、300mL/cm²が好ましく、さらに好ましくは30mL/cm²、特に好ましくは3mL/cm²、また、この下限は0.0003mL/cm²が好ましく、さらに好ましくは0.003mL/cm²、特に好ましくは0.03mL/cm²である。変温動物由来細胞（A）と基材（B）とを接着させる方法および本発明の細胞接着基材を用いて細胞培養し細胞を生産する方法において、培養に用いられる培地としては、細胞培養に使用される公知のものが使用でき、例えば、Grace培地、IPL-41培地、Schneider培地、TC-100培地、Sf-900II培地、Ex-cell 405培地、Express-Five培地、Drosophila培地、MEM培地、DMEM培地、ハムF-12培地、RPMI培地、及びこれらの培地の混合物等が挙げられる。

【0047】これらの培地には、抗菌剤（アンホテリシンB、ゲンタマイシン、ペニシリン及びストレプトマイシン等）、血清（ヒト血清、ウシ血清、ウマ血清及びヒツジ血清等）等公知の添加剤を含有させることができる。抗菌剤を含有する場合、培地中の抗菌剤の濃度は、培地の容量に基づいて、1ng/L～100g/Lが好ましく、さらに好ましくは10ng/L～10g/Lである。すなわち、この場合、抗菌剤濃度の上限は100g/Lが好ましく、さらに好ましくは10g/Lであり、同様に下限は1ng/Lが好ましく、さらに好ましくは10ng/Lである。

【0048】血清は含有しない方が好ましいが、血清を含有する場合、培地中の血清の濃度は、血清由来のウイルス等による感染の危険性を下げるために、培地の全容量に対して、1×10⁻⁶～50%（v/v）が好ましく、さらに好ましくは1×10⁻⁶～10%（v/v）であり、特に好ましくは1×10⁻⁶～2%（v/v）である。すなわち、この場合、血清濃度の上限は50%（v/v）が好ましく、さらに好ましくは10%（v/v）であり、特に好ましくは2%（v/v）であり、同様に下限は1×10⁻⁶%（v/v）が好ましく、さらに好ましくは1×10⁻⁶%（v/v）であり、特に好ましくは1×10⁻⁶%（v/v）である。

【0049】細胞接着性人工ペプチド（X）及び/又は細胞接着補助人工ペプチド（Y）を用いることにより、変温動物由来細胞（A）、特に昆虫細胞を効率良く基材（B）に接着させることができるため、有用蛋白質を生産できるウイルス感染の昆虫細胞を効率良く作製することができる。このウイルスとしては、昆虫細胞に感染できるウイルスで有れば制限なく、バキュロウイルス等が挙げられる（「生物化学実験法45組換えタンパク質生産法、塚越規弘編著、株式会社学会出版センター発行、2001年」や「昆虫バイオ工場、木村滋編著、株式会

社工業調査会発行、2000年」}。ウイルス感染の昆虫細胞の作製方法としては、例えば、トランスファーベクターに発現させたい遺伝子を組み込み、昆虫感染性のウイルスDNAとともに昆虫細胞にトランスフェクトした後、プラークアッセイによってウイルス感染昆虫細胞を選別する方法などが挙げられる（「生物化学実験法45組換えタンパク質生産法、塚越規弘編著、株式会社学会出版センター発行、2001年」や「昆虫バイオ工場、木村滋編著、株式会社工業調査会発行、2000年」}）。

【0050】ウイルス感染の昆虫細胞等の変温動物由来細胞（A）が生産する有用蛋白質としては、例えば、ワクチン、検査・診断薬用の原料、獣医薬、畜産薬、医薬及び殺虫剤等が挙げられる（「生物化学実験法45組換えタンパク質生産法、塚越規弘編著、株式会社学会出版センター発行、2001年」や「昆虫バイオ工場、木村滋編著、株式会社工業調査会発行、2000年」}）。

【0051】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0052】＜実施例1＞（Sf9細胞と基材との接着1）

（1）ペプチド（Z）の準備

特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、Arg Gly Asp配列と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（35）とを各々約12個有し、数平均分子量約10万のペプチド”SLPF”を遺伝子組み換え大腸菌により製造した。

【0053】（2）SLPFの基材への付着

SLPFの1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、99.5%の塩化ナトリウムを0.85重量%で含有する0.02M、pH7.2のリン酸緩衝液（以下、PBS）で100倍希釈して、SLPF水溶液（10μg/mL）を作製した。このSLPF水溶液を24穴のポリスチレンプレート（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）に1mL/穴で投入し25℃で2時間静置させた。その後残存するSLPF水溶液をアスピレーターで吸引除去し、さらに3mLの蒸留水で穴を3回洗浄して、SLPF付着量が約1μg/cm²のSLPF付着基材を作製した。

【0054】（3）Sf9細胞（ウイルス未感染細胞）の接着

このSLPF付着基材の1穴あたりに1mLのSf-900II培地（インビトロジェン株式会社製）及び20万cells分のSf9細胞（インビトロジェン株式会社製）液とを投入し28℃で1時間静置させて、Sf9を基材に接着させて、本発明の細胞接着基材1を得た（Sf9の接着量：約5万cells/cm²）。

【0055】＜実施例2＞

（Sf9細胞と基材との接着2）

（1）ペプチド（X）の準備

Arg Gly Asp Ser配列（14）を有するFibronectin Active Fragment（以下、FAF、株式会社ペプチド研究所製）をそのまま使用した。

【0056】（2）FAFの基材への付着

FAFの1mgをPBSの100mLに溶解し、FAF水溶液（10μg/mL）を作製した。そのFAF水溶液を24穴のポリスチレンプレート（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）に1mL/穴で投入し25℃で2時間静置させた。その後、残存するFAF水溶液をアスピレーターで吸引除去し、さらに3mLの蒸留水で穴を3回洗浄して、FAF付着量が約1μg/cm²のFAF付着基材を作製した。

【0057】（3）Sf9細胞の接着

このFAF付着基材の1穴あたりに1mLのSf-900II培地（インビトロジェン株式会社製）及び20万cells分のSf9細胞（インビトロジェン株式会社製）液とを投入し28℃で1時間静置させて、Sf9を基材に接着させて、本発明の細胞接着基材2を得た（Sf9の接着量：約4万cells/cm²）。

【0058】＜実施例3＞

（Sf9細胞と基材との接着3）

（1）ペプチド（Y）の準備

特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（35）を約170個有し、数平均分子量約10万のペプチド”SLP4”を遺伝子組み換え大腸菌により製造した。

30 【0059】（2）SLP4の基材への付着

SLP4の1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、PBSで100倍希釈し、SLP4水溶液（10μg/mL）を作製した。そのSLP4水溶液を24穴のポリスチレンプレート（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）に1mL/穴で投入し25℃で2時間静置させた。その後残存するSLP4水溶液をアスピレーターで吸引除去し、さらに3mLの蒸留水で穴を3回洗浄して、SLP4付着量が約1μg/cm²のSLP4付着基材を作製した。

40 【0060】（3）Sf9細胞の接着

このSLP4付着基材の1穴あたりに1mLのSf-900II培地（インビトロジェン株式会社製）及び20万cells分のSf9細胞（インビトロジェン株式会社製）液とを投入し28℃で1時間静置させて、Sf9を基材に接着させて、本発明の細胞接着基材3を得た（Sf9の接着量：約4万cells/cm²）。

【0061】＜実施例4＞

（HIGH FIVEと基材との接着1B）実施例1のSf9細胞の代わりにHIGH FIVE（ウイルス未感染細胞）を使用し、Sf-900II培地の代わりに

Express-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を使用した以外は、実施例1と同様にして、本発明の細胞接着基材1Bを得た（HIGH FIVEの接着量：約7万cells/cm²）。

【0062】＜実施例5＞

（HIGH FIVEと基材との接着2B）実施例2のSf9細胞の代わりにHIGH FIVE（ウイルス未感染細胞）を使用し、Sf-900II培地の代わりにExpress-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を使用した以外は、実施例2と同様にして、本発明の細胞接着基材2Bを得た（HIGH FIVEの接着量：約5万cells/cm²）。

【0063】＜実施例6＞

（HIGH FIVEと基材との接着3B）実施例3のSf9細胞の代わりにHIGH FIVE（ウイルス未感染細胞）を使用し、Sf-900II培地の代わりにExpress-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を使用した以外は、実施例3と同様にして、本発明の細胞接着基材3Bを得た（HIGH FIVEの接着量：約5万cells/cm²）。

【0064】＜比較例1＞

（Sf9細胞と基材との接着4）

（1）コラーゲンの準備

ウシ由来のコラーゲンタイプ1（以下、COL、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、Arg Gly Asp Ser配列（14）を含む天然蛋白質）をそのまま使用した。

【0065】（2）COLの基材への付着

COLの1mgを0.05N塩酸水溶液の100mLに溶解し、COL水溶液（10μg/mL）を作製した。そのCOL水溶液を24穴のポリスチレンプレート（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）に1mL/穴で投入し25℃で2時間静置させた。その後、残存するCOL水溶液をアスピレーターで吸引除去し、さらに3mLの蒸留水で穴を3回洗浄して、COL付着量が約1μg/cm²のCOL付着基材を作製した。

【0066】（3）Sf9細胞の接着

このCOL付着基材の1穴あたりに1mLのSf-900II培地（インビトロジェン株式会社製）及び20万cells分のSf9細胞（インビトロジェン株式会社製）液とを投入し28℃で1時間静置させて、Sf9を基材に接着させて、比較用の細胞接着基材4を得た（Sf9の接着量：約3万cells/cm²）。

【0067】＜比較例2＞

（Sf9細胞と基材との接着5）

（1）フィブロインの準備

フィブロイン（以下、FIB、和光純薬工業株式会社製、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列（12）を含む天然蛋白質）をそのまま使用した。

【0068】（2）FIBの基材への付着

FIBの1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、PBSで100倍希釈し、FIB水溶液（10μg/mL）を作製した。そのFIB水溶液を24穴のポリスチレンプレート（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）に1mL/穴で投入し25℃で2時間静置させた。その後、残存するFIB水溶液をアスピレーターで吸引除去し、さらに3mLの蒸留水で穴を3回洗浄して、FIB付着量が約1μg/cm²のFIB付着基材を作製した。

【0069】（3）Sf9細胞の接着

このFIB付着基材の1穴あたりに1mLのSf-900II培地（インビトロジェン株式会社製）及び20万cells分のSf9細胞（インビトロジェン株式会社製）液とを投入し28℃で1時間静置させて、Sf9を基材に接着させて、比較用の細胞接着基材5を得た（Sf9の接着量：約3万cells/cm²）。

【0070】＜比較例3＞

（HIGH FIVEと基材との接着4B）比較例1のSf9細胞の代わりにHIGH FIVE（ウイルス未感染細胞）を使用し、Sf-900II培地の代わりにExpress-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を使用した以外は、比較例1と同様にして、本発明の細胞接着基材4Bを得た（HIGH FIVEの接着量：約5万cells/cm²）。

【0071】＜比較例4＞

（HIGH FIVEと基材との接着5B）比較例2のSf9細胞の代わりにHIGH FIVE（ウイルス未感染細胞）を使用し、Sf-900II培地の代わりにExpress-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を使用した以外は、比較例2と同様にして、本発明の細胞接着基材5Bを得た（HIGH FIVEの接着量：約4万cells/cm²）。

【0072】＜評価1A＞実施例1～3及び比較例1～2のSf9接着基材について、Sf9の接着性を評価するために、これらの基材中の培地をアスピレーターで吸引除去し、基材の1穴あたりに0.5mLのPBS及び0.1mLのテトラカラーワン（商品名：生化学工業株式会社製テトラゾリウム塩）を投入し25℃で4時間静置させた。なお、テトラカラーワンのテトラゾリウム塩が細胞内ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼにより還元されて、ホルマザンを生成することにより発色する。その後、分光光度計を用いて450nm（対照波長630nm）の吸光度を測定し、この値を接着活性とした。これらの結果を表1に示す。

【0073】

【表1】

19
接着活性の評価

		基材に付着された ペプチド等	接着活性 (450nm吸光度)
実施例	1	SLPF	0.25
	2	FAF	0.20
	3	SLP4	0.21
比較例	1	COL	0.16
	2	FIB	0.17

【0074】＜評価1B＞実施例4～6及び比較例3～4のHIGH FIVE接着基材について、HIGH FIVEの接着性を評価するために、これらの基材中の培地をアスピレーターで吸引除去し、基材の1穴当たり0.5mLのPBS及び0.1mLのテトラカラーワ

* 度計を用いて450nm（対照波長630nm）の吸光度を測定し、この値を接着活性とした。これらの結果を表2に示す。

【0075】

【表2】

接着活性の評価

		基材に付着された ペプチド等	接着活性 (450nm吸光度)
実施例	4	SLPF	0.32
	5	FAF	0.25
	6	SLP4	0.27
比較例	3	COL	0.25
	4	FIB	0.23

表1及び2の結果から、本発明の細胞接着基材は、比較例に比べて接着活性が極めて高いことが判る。

【0076】＜評価2A＞実施例1～3及び比較例1～2のSf9接着基材の細胞増殖活性を評価するために、Sf9接着基材の1穴当たり1mLのSf-900I I培地（インビトロジェン株式会社製）を投入し28℃で3日間静置させてSf9を増殖させた後、培地をアスピレーターで吸引除去し、基材の1穴当たり0.5m

LのPBS及び0.1mLのテトラカラーワン（生化学工業株式会社製）を投入し25℃で4時間静置させた。その後、分光光度計を用いて450nm（対照波長630nm）の吸光度を測定し、この値を増殖活性とした。これらの結果を表3に示す。

【0077】

【表3】

		基材に付着された ペプチド等	増殖活性 (450nm吸光度)
実施例	1	SLPF	0.93
	2	FAF	0.83
	3	SLP4	0.81
比較例	1	COL	0.72
	2	FIB	0.69

【0078】＜評価2B＞実施例4～6及び比較例3～4のHIGH FIVE接着基材の細胞増殖活性を評価するために、HIGH FIVE接着基材の1穴あたりに1mLのExpress-Five培地（インビトロジェン株式会社製）を投入し28℃で3日間静置させて20 HIGH FIVEを増殖させた後、培地をアスピレーターで吸引除去し、基材の1穴あたりに0.5mLのP*

増殖活性の評価

*BS及び0.1mLのテトラカラーワンを投入し25℃で4時間静置させた。その後、分光光度計を用いて450nm（対照波長630nm）の吸光度を測定し、この値を増殖活性とした。これらの結果を表4に示す。

【0079】

【表4】

		基材に付着された ペプチド等	増殖活性 (450nm吸光度)
実施例	4	SLPF	1.42
	5	FAF	1.20
	6	SLP4	1.41
比較例	3	COL	1.18
	4	FIB	1.09

表3及び4の結果から、本発明の細胞接着基材は、比較例に比べて細胞増殖性が極めて高いことが判る。

【0080】

【発明の効果】本発明の細胞接着基材は、変温動物由来細胞（A）を極めて効率良く基材に接着でき、さらに変温動物由来細胞（A）を効率良く増殖できる。すなわち、本発明の細胞接着基材は、天然由来のコラーゲンや絹蛋白質等を使用しなくても、細胞接着性が極めて高 ※

※い。従って、本発明の細胞接着基材は、プリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性がある天然由来の蛋白質等を含まないため、極めて安全性が高い。また、極めて効率よく変温動物由来細胞を増殖させることができる。

【0081】

【配列表】

<110>三洋化成工業株式会社；SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120>変温動物由来細胞の細胞接着基材

<130>P5796

<150>特願2001-351232

<151>2001-11-16

<160>45
 <210>1
 <211>4
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>1

Arg Glu Asp Val
 1

<210>2
 <211>5
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>2

Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5

<210>3
 <211>5
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>3

Pro Asp Ser Gly Arg
 1 5

<210>4
 <211>7
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>4

Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg
 1 5

<210>5
 <211>6
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>5

Leu Gly Thr Ile Pro Gly
 1 5

<210>6
 <211>10
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>6

Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile
 1 5 10

<210>7
 <211>5
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>7

(14)

特開2003-210166

25

26

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210>8

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

Asp Gly Glu Ala

1

<210>9

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>9

Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro

1 5 10 15

<210>10

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>10

Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys

1 5 10

<210>11

<211>8

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser

1 5

<210>12

<211>6

<212>PRT

<213>Bombyx mori

<400>12

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

1 5

<210>13

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>13

Gly Val Gly Val Pro

1 5

<210>14

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>14

Arg Gly Asp Ser

1

<210>15

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>15

Gly Arg Gly Asp Ser

1 5

<210>16

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>16

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1 5

<210>17

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>17

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro

1 5 10

<210>18

<211>12

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>18

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala

1 5 10

<210>19

<211>14

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>19

Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser

1 5 10

<210>20

<211>19

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>20

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser

1 5 10 15

Ala Asp Arg

<210>21

<211>12

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>21

Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp
 1 5 10

<210>22

<211>16

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>22

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 1 5 10 15

<210>23

<211>32

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>23

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 20 25 30

<210>24

<211>64

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>24

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 20 25 30
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 35 40 45
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser
 50 55 60

<210>25

<211>40

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>25

Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg
 20 25 30
 Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser
 35 40

<210>26

<211>48

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>26

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp
 1 5 10 15

31

32

Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg
 20 25 30
 Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro
 35 40 45

<210>27

<211>40

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>27

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Lys Pro Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Arg Gly
 20 25 30
 Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro
 35 40

<210>28

<211>48

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>28

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser
 20 25 30
 Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala
 35 40 45

<210>29

<211>56

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>29

Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser
 20 25 30
 Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Ile Lys
 35 40 45
 Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser
 50 55

<210>30

<211>76

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>30

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val
 20 25 30
 Ala Val Ser Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser
 35 40 45

(18)

特開2003-210166

33

34

Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln

50 55 60

Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg

65 70 75

<210>31

<211>48

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>31

Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro

1 5 10 15

Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly

20 25 30

Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp

35 40 45

<210>32

<211>9

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>32

Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly

1 5

<210>33

<211>15

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>33

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln

1 5 10 15

<210>34

<211>15

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>34

Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro

1 5 10 15

<210>35

<211>54

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>35

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala

20 25 30

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

35 40 45

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

50

35

36

<210>36

<211>5

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>36

Gly Ala Ala Gly Tyr

1 5

<210>37

<211>40

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>37

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

1 5 10 15

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

20 25 30

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

35 40

<210>38

<211>48

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>38

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala

20 25 30

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

35 40 45

<210>39

<211>60

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>39

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

1 5 10 15

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

20 25 30

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

50 55 60

<210>40

<211>80

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>40

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

1 5 10 15

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

37

38

20 25 30
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 35 40 45
 Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 50 55 60
 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 65 70 75 80

<210>41

<211>36

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>41

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala
 20 25 30
 Gly Ala Gly Ser
 35

<210>42

<211>24

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>42

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser
 20

<210>43

<211>15

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>43

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
 1 5 10 15

<210>44

<211>72

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>44

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala
 20 25 30
 Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser
 35 40 45
 Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser
 65 70

<210>45

<211>30

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>45

Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly
1			5				10					15			
Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro		
			20				25					30			

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08
 GA03 GB04 GB05
 4B033 NA01 NA02 NA16 NB01 NB12
 NB13 NB57 NC04 ND02 NE02
 NF06
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA20
 4B065 AA90X AB01 AC14 BA01
 CA24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.